(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0094416
(43) 공개일자 2007년09월20일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29(2006.01) *C07K 14/415*(2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0025073
(22) 출원일자 2006년03월17일
심사청구일자 2006년03월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
황병국
서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호
홍점규
서울 강북구 수유5동 516-58 미광빌라 가동 101호
김상희
서울 마포구 합정동 373-3
(74) 대리인
김선애

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 식물병 방어 세포막 단백질 유전자 (CaPIMP1),이의 프로모터 및 이를 이용한 병저항성 형질전환 식물

(57) 요 약

본 발명은 고추 한별 품종에서 분리한 식물병 방어 세포막 단백질 유전자인 CaPIMP1 유전자, 상기 유전자 염기서열에 의해 코딩되는 식물병 방어 세포막 단백질 및 상기 유전자의 프로모터에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물체 병저항성 형질전환식물 및 병원균, 화학물질 또는 환경스트레스 저항성 유도처리시 유도저항성 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균에 대한 방어반응의 표지 및 식물병 저항성 식물의 분자육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진시킬 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1

```
   1 CGCACACAAAAAAAAAAAAAAAACCTAGTTTAAATTCAATAAAATTTATTTTATTTTGCTT
  61 CTATTTTAGTTGAATAGACAAAGTGAAATGACACCGCCACCAACTACCACTGTTCCTCCT
 121 TACGTTAGCCTCATCGTGAGGATCCTTACGTTGATTTGCTTGTTGATTTCATTCATCGTG
 181 ATTGCCACCAACAATCAGACGGTTAGTACCGTTGCTGGTGATGTCAAAATCAAGTTTAAG
 241 GACTTTTATGCTTACAGATATTTAATTGCTACTGTGATTATTGGAATGGCATATACTCTT
 301 CTTCAAATTGCCTTTTCAATTTCCCTTTTGACTACTGGAAATCGCATTGGTGGTGAAGGG
 361 TTTCTTCTTTTTGACTTCTACGGTGACAAGTTTATTTCCTACTTCCTAGTTACCGGAGCA
 421 GCAGCAAGTTTTGGTATGACACAAGATTTAAAGCAACTTGAAGGAAGTGATAACTATAGT
 481 AAATTTCTCAACACTTCAAATGCTGCAGCAAGTCTTTGTCTAATTGGATTCTTTTTTGCT
 541 GTTGCTTCATCAATTTTCTCATCTTATAATCTTCCAAAGAGAATTTGATTTTTTTTTTGA
 601 AAAAGTAATAGTTTGATTCAGTGTTTCGAGAAATTATGTTTTATAGGATTTTCGAAGATG
 661 ATCTAGATATTGGGTCAAATTACGTTTATTATAAGTCCCAACAATAGAGTGGTTCTCCCG
 721 GCAAGGAGTCGTAACATTTGTTGGTGTACCTCATAGTTTGGGCTGTAGCTTCTTCTTCTT
 781 TTGCCACATTTGGATAGTTTTTTATGAAGTGTTGAGATGTAATATTTGTATTTTATTTGA
 841 AATTGTATGTAATTGTTTAAGTTGGTGAAGTTGTGTGAATTTCAAGTTGGATTTTGTGTT
 901 ATTTATGTAATTCTTTGTTTTGAGAATAGTCTTCAATTTGGGTATTTTCTTGTGTATTCT
 961 TTAGAAATTGTATTTTTCAAAGTCGATACAAATATAAGCCAGCTAAAAAGCAAACATTTA
1021 ATATATGAAATTCGTCTTTAGCACATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

특허청구의 범위

청구항 1

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 분리된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물병 방어 세포막 단백질 유전자(CaPIMP1).

청구항 2

제1항 기재의 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 식물병 방어 세포막 단백질.

청구항 3

서열번호 3의 염기서열을 갖는 제1항 기재의 식물병 방어 세포막 단백질 유전자 CaPIMP1의 프로모터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로모터는 제1항 기재의 식물병 방어 세포막 단백질 CaPIMP1 유전자의 시작 코돈 ATG로부터 업스트림(upstream) 부위 (-1193) 내지 (-1017) 부위를 포함하는 프로모터.

청구항 5

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 기재의 유전자 또는 제5항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 박테리아.

청구항 7

제1항 기재의 유전자 또는 제5항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 애기장대.

청구항 8

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

고추세균성점무늬병의 병원성균 또는 비병원성균을 접종한 고추의 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ^{32}P를 처리한 제1항 기재의 CaPIMP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaPIMP1유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 9

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

에틸렌, 메틸자스모네이트, 엡시식산 및 베타-아미노부티르산 중 어느 하나를 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ^{32}P를 처리한 제1항 기재의 CaPIMP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaPIMP1유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 10

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

상처 또는 저온을 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ^{32}P를 처리한 제1항 기재의 CaPIMP1 유전자 프로브와 반응시켜 CaPIMP1 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 11

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

병원균을 접종한 식물에서 GUS 리포터 유전자에 융합된 제3항 기재의 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성화를 확인

하여 식물체의 저항성을 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 12

식물체의 저항성 탐색방법에 있어서,

화학물질을 접종한 식물에서 GUS 리포터 유전자에 융합된 제3항 기재의 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성화를 확인하여 식물체의 저항성을 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 13

제3항 기재의 프로모터를 증폭하기 위한 서열번호 4 또는 서열번호 5의 PCR 프라이머.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 고추 한별 품종에서 분리한 식물병 방어 세포막 단백질 유전자인 CaPIMP1 유전자, 상기 유전자 염기서열에 의해 코딩되는 식물병 방어 세포막 단백질 및 상기 유전자의 프로모터에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물체 병저항성 형질전환식물 및 생물적/화학적 저항성 유도처리시 유도저항성 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법도 제공한다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추세균성점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 신규 저항성 관련 유전자인 CaPIMP1 유전자를 분리하여 해독(Sequencing)함으로써 그 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하고, 이를 근거로 이 유전자의 프로모터를 분리, 염기 서열을 제공한다. 이 유전자 및 프로모터 염기서열을 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도처리 시 유도저항성의 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법 및 이 유전자를 이용한 병저항성 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

<12> 담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추는 우리나라에서 오래전부터 향신료 또는 양념으로 사용되어 온 대표적인 작물로서, 그에 대한 병으로는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 고루 다양하게 보고되어 있는데, 그 중 치명적인 것으로 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성점무늬병 등을 들 수 있다.

<13> 고추에 대한 이러한 식물병들을 방제하기 위해 지금까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔는데, 그 독성으로 인하여 병원균뿐만 아니라 주변 생태계의 생물까지도 대량 살상하여 생태계를 파괴시키고 토양과 수질을 오염시키는 폐해가 있어 왔다.

<14> 따라서 앞으로는 식물이 처해 있는 환경 및 조건을 고려하여 물리적/생물학적 방제수단을 적절히 혼용함으로써 농약의 사용을 가능한 줄이는 방법을 사용하는 것이 바람직하다고 할 수 있으며, 더 바람직하게는 병에 대해 저항성을 가지고 있는 저항성 품종의 개량 및 육종 등을 통해 병 발생 자체를 억제하는 방법을 찾는 것이 바람직하다 할 수 있다.

<15> 사실, 그동안 농약을 사용하지 않고 병해충에 의한 피해를 감소시키기 위한 노력의 일환으로 고추를 비롯한 다양한 작물 및 병원균을 대상으로 병 저항성 작물의 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 병 저항성 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구가 역시 고추를 비롯한 여러 가지 작물 및 모델식물을 대상으로 실시되어 왔다.

<16> 일단 식물이 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 시작하는데, 이러한 방어기작에 의해 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 반응이 친화적 반응과 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 여부가 결정되는 것이다.

<17> 불친화적 반응에서, 감염된 식물은 자체의 인식작용에 의해 병원균의 침입을 인지하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive reaction), 캘로스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리는 방어 단백질을 생성

하는 것으로 알려져 있다.

<18> 이러한 방어 기작들은 병원균의 침입하는 경우뿐만 아니라, 살리실산이나 아미노부티르산 등 인위적인 화학적 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, pH 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.

<19> 이렇게 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스를 줌으로써 유도되는 저항성을 일반적으로 유도저항성이라고 하는데, 이러한 저항성 유도 반응은 식물이 병원체에 대해 방어할 수 있는 능력에서 중요한 역할을 하는 신호전달경로로써 평가된다.

<20> 이것은, 이와 같은 유도저항성이 신호전달에 대한 모형으로서 흥미가 있으며 실용적인 가치가 있을 뿐만 아니라, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 이용될 수 있기 때문이다.

<21> 근래, 이러한 유도저항성 연구는 유전공학적 기술의 개입에 의해 훨씬 더 그 발전 속도가 빨라졌는데, 종래에는 저항성 유도 처리를 한 후 저항성 발현 여부를 확인하기 위해 식물을 재배하고 병을 접종한 후 저항성이 나타나는지의 여부를 확인해야 했던 반면, 지금은 유도하고자 하는 저항성 관련 단백질을 코딩하는 유전자를 밝혀내고 이를 이용하여 실험실 수준에서 저항성 발현 여부를 확인할 수 있게 됨으로써, 포장(Field)에서의 작물재배, 병 접종, 병반 출현 여부 확인 등의 절차를 생략할 수 있게 되었기 때문이다.

<22> 이것은 전체적인 저항성 유도 시험의 주기를 단축함으로써 종래에 비해 더 짧은 시간 내에 더 많은 시험을 할 수 있게 되었음을 의미하며, 결국 더 우수한 저항성 품종을 개발할 수 있게 되었음을 의미한다.

<23> 그러나, 이것은 유도하고자 하는 유전자 서열이 밝혀지고 이에 따라 해당 유전자의 클론이 확보되어 있다는 전제하에 가능한 것으로서, 이러한 의미에서, 식물 병에 저항성을 나타내는 다양한 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적함으로써, 이를 이용한 탐색방법을 촉진시키는 것은 시급한 당면 과제라고 할 수 있다.

<24> 병생성 관련 단백질을 코딩하는 신규 유전자들의 발굴을 통하여 병저항성 형질전환 식물체를 개발하는 것이 유전공학적인 식물병 방제 기술 개발에 있어 최종적인 목적이다. 지금까지는 형질전환 식물체의 전 조직에서 높은 발현은 유도하는 컬리플라워 모자이크 바이러스(Cauliflower Mosaic Virus)의 35S 프로모터나 옥수수의 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자의 프로모터를 사용하여 왔다. 그러나 이들 프로모터들에 의해 항시 활성화되는 유전자들의 영향으로 병 방어과정 뿐 아니라 에너지 대사에 문제를 일으키거나 그 밖의 식물 생장 등에 영향을 미치는 경우가 문제가 되고 있다. 이에 병방어 과정에 특이적인 프로모터의 개발이 필요한 실정이다.

<25> 수많은 병생성 관련 유전자들이 분리되어 오늘날에 이르지만 실제적으로 병저항성에 기여하는 유전자를 찾는 일은 쉽지 않다. 그러므로 이들 유전자를 모델 식물에 도입하여 병저항성의 증진 여부를 검토하는 연구가 선행될 필요가 있다. 애기장대와 같은 모델 식물을 이용한 병저항성 형질전환식물의 제조로 기능이 확인된 병생성관련 유전자들을 주요 작물에 도입하기 위한 분자 육종의 기초를 마련할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<26> 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은 식물병에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 방어관련 유전자의 하나인 세포막 단백질을 코딩하는 CaPIMP1 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

<27> 본 발명의 다른 목적은 상기 CaPIMP1 유전자의 프로모터의 염기서열을 제공하고 이를 이용하여 식물병에 대한 저항성 형질전환 식물체를 제공하고자 하는 것이다.

<28> 또한, 본 발명의 목적은 상기 유전자 및 그 프로모터를 이용하여 병원균 및 화학물질 등에 대해 저항성 유도 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<29> 본 발명의 상기 목적은, 고추세균성점무늬병의 접종으로 과민성 반응이 나타난 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에서 mRNA를 분리한 다음 cDNA 라이브러리를 제조한 후 이를 스크린하여 신규 병방어 관련 세포막 단백질 유전자(CaPIMP1)를 선발한 후 그 염기서열을 결정하고, 고추에 병원균 또는 화학물질을 접종 또는 처리

하여 상기 CaPIMP1 유전자의 발현 여부를 조사함으로써 달성하였다.

<30> 본 발명은 또한 상기 유전자의 프로모터 그리고 상기 유전자 및 프로모터를 이용한 식물체의 저항성 탐색방법과 재조합 벡터 및 형질전환 식물을 제공한다.

<31> 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세히 설명한다.

<32> 먼저, 본 발명은, 고추세균성점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 의해 저항성이 유도된 한별 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 각각의 mRNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하여 여기에서 생성된 DNA 조각을 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지함으로써 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 얻고, 이 클론 중 세포막 단백질 코딩 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)하여 이 유전자를 CaPIMP1으로 명명하고 서열번호 1을 부여하였다(도 1 참조).

<33> 상기 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에서 분리된 CaPIMP1 유전자는 고추세균성점무늬병에 대한 방어기작을 가지는 병생성 관련 단백질(PR protein)의 일종인 세포막 단백질을 코딩하는 유전자이다. GenBank 검색결과 이 유전자와 유사한 염기서열 또는 아미노산 서열을 가지는 다른 식물 유전자는 단지 애기장대(Arabidopsis)에서만 밝혀져 있다. 따라서 CaPIMP1 유전자는 단지 몇 개의 애기장대의 기능 명칭이 확실하지 않은 단백질들(hypothetical proteins)과 상동성만이 나타나 신규한 유전자이다.

<34> 이 유전자의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)은 애기장대의 유사단백질의 아미노산 서열과 함께 도 2에 나타나 있다(도 2 참조).

<35> 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 166개의 아미노산으로 구성되며, 분자량이 약 18 kDa 정도의 염기성 단백질이며, 특히 아미노산 서열에 존재하는 막 투과성 도메인은 이 단백질이 세포막에 존재하는 막 단백질을 코딩함을 보여준다.

<36> 이와 같은 세포막 단백질은 다른 식물들에서 이미 그 존재가 발견 및 분리되었는데, 이들의 발현은 식물 병원균에 의한 감염뿐만 아니라 비생물적인 요인들, 즉, 물리적인 상처와 염류, 자외선 등의 환경적인 요인들에 대한 스트레스 반응에 관여되는 것으로 알려져 있으나, 본 발명의 CaPIMP1과 유사한 종류의 세포막 단백질에 대한 연구 보고는 없다.

<37> 본 발명에 의한 유전자 CaPIMP1의 코딩 영역의 말단에 녹색형광단백질(Green Fluorescent Protein; GFP)을 코딩하는 유전자를 융합시켜 벡터를 제조하여 일시적 발현을 유도하여 현광현미경으로 관찰한 결과 세포막에서만 녹색형광단백질을 관찰하여, 상기 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 세포내 위치가 세포막인 것을 확인하였다(도 4 참조).

<38> 한편, 유전자의 발현 조절 기작을 상세히 연구하기 위해 해당 유전자의 프로모터의 기능 분석이 필수적이다. 따라서 본 발명은, 상기와 같이 염기서열이 제공된 CaPIMP1의 유전자를 이용하여 서열번호 3으로 표시되는 CaPIMP1 유전자의 프로모터를 분리하여 제공한다(도 3 참조).

<39> 나아가, 본 발명은 병원성 균주 또는 비병원성 균주, 화학물질, 환경스트레스를 접종 또는 처리한 식물에서 상기 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 유전자 CaPIMP1의 유도 발현 여부를 확인하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공한다.

<40> 즉, 병에 대하여 저항성인 식물체는 병원체 등의 침입 시 다양한 방어반응을 나타내는데, 병생성 단백질의 유도 발현은 식물체의 저항성을 나타내는 분자적 표지로 볼 수 있다. 본 발명에 의한 병생성 단백질 유전자 CaPIMP1이 다양한 식물병원균, 화학물질 또는 환경스트레스에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 5 내지 도 7b 참조). 따라서 본 발명에 의한 유전자 CaPIMP1은 식물체의 저항성 탐색방법에 이용될 수 있다.

<41> 상기 식물병원균은 고추세균성점무늬병의 병원성균 또는 비병원성균일 수 있고, 상기 화학물질은 에틸렌, 메틸자스모네이트, 엡시식산 및 베타-아미노부티르산 중 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 환경스트레스는 상처 또는 저온일 수 있다.

<42> 또한, 본 발명은 병원균 또는 화학물질을 접종 또는 처리한 식물에서 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성화를 확인하여 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 상기 병원균은 담배들불병균일 수 있고,

상기 화학물질은 엡시식산, 소디움 나이트로푸르사이트, 에틸렌, 메틸자스모네이트일 수 있다. 도 8 내지 도 9는 상기 병균 또는 화학물질을 접종 또는 처리한 경우 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자 프로모터가 활성화됨을 나타낸다. 또한, 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자 프로모터 중 CaPIMP1 유전자의 시작 코돈 ATG로부터 업스트림(upstream) 부위로 -1193 부위 및 -1017 부위가 담배들불병균 반응에 최소한 활성화 영역임이 확인되었다(도 8 참조).

<43> 나아가, 본 발명은 상기와 같이 염기서열이 제공된 CaPIMP1의 유전자를 이용하여 재조합 벡터를 제조하고 애기장대를 형질전환시켜서 병저항성의 증가를 통하여 병저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 도 10a 및 도 10b는 병원성 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주 감염에 대한 본 발명의 CaPIMP1 유전자 도입 형질전환 애기장대의 병 저항성을 나타내는 도면이다. 상기 애기장대의 형질전환 방법은 본 발명이 속하는 분야의 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어 아그로박테리움을 이용한 꽃침지 방법 등을 이용할 수 있다.

<44> 이하, 실시예들을 통해 본 발명을 더 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<45> [실시예 1] 식물병방어 세포막 단백질을 코딩하는 CaPIMP1 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결정

<46> 식물의 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 본 발명에 의한 식물병 방어 세포막 단백질 코딩 유전자의 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<47> 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에 고추세균성점무늬병의 비병원성균인 BV5-4a(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain BV5-4a)를 접종하고 18시간 동안 습실처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 꺼내어 잎을 수거하였다.

<48> 그 다음, 수거된 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction)증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다.

<49> 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나일론막에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하고, 여기에서 생성되는 DNA 조각을 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 상기 cDNA와 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

<50> 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주가 접종된 식물체의 DNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

<51> 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5 '-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 세포막 단백질 코딩 유전자임을 확인하고 CaPIMP1 유전자로 명명하였다(도 1 참조).

<52> 이 CaPIMP1 유전자에서 유추한 아미노산 서열을 다른 식물에서 발견된 세포막 단백질의 아미노산 서열과 비교한 결과, 애기장대(Arabidopsis) 단백질의 아미노산 서열과 22-38 %의 상동성을 나타냄으로써 신규한 것임을 알 수 있었다(도 2 참조).

<53> 확인된 CaPIMP1 유전자의 염기서열을 도 1에 나타내고 서열번호 1로 표시하고, 상기 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 도 2에 나타나 있으며 서열번호 2로 표시하고 서열목록으로 제출하였다.

<54> [실시예 2] 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자의 프로모터 분리

<55> 발현 조절 기작을 상세히 연구하기 위해 프로모터의 기능 분석이 필수적이다. 유전체로부터 프로모터의 분리를 위해 고추 식물체로부터 게놈유전자(genomic DNA)를 추출하고 고추 게놈유전자(genomic DNA)의 각 분취액(aliquot)을 각각 블런트-엔드(blunt-end)를 형성시키는 DraI, EcoRV, PvuII, StuI 등의 여러 가지 제한효소로 잘라주었다.

<56> 게놈워커키트(Genome Walker Kit, clontech)에서 제공되는 어댑터(adapter)를 제한효소로 잘려진 DNA의 양 말단에 리가제(ligase)를 이용하여 붙이고, 이를 주형으로 하여 프로모터를 분리하기 위해 PCR과 네스티드 PCR(nested PCR)을 수행하였다.

<57> PCR에 사용되는 프라이머는 어댑터(adaptor)에 존재하는 염기서열에 근거한 키트(kit)에서 제공된 프라이머(AP1, AP2)와 프로모터를 분리하고자 하는 병방어 관련 유전자에 특이적인 염기서열을 근거로 작성한 두 개의

리버스(reverse) 프라이머로 구성되었다. AP1과 짝을 이루는 1차 증폭용 프라이머는 5'-AAATGTTTCTGACAAAATTTCATAGTTT-3'(서열번호 4)이며, AP2와 짝을 이루는 2차 증폭용 프라이머는 5'-AGCATAAAAGTCCTTAAACTTGATTTTGA-3'(서열번호 5)이다.

<58> 이로부터 증폭된 PCR 산물을 pCR2.1-TOPO 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 염기서열을 밝혀 병방어 관련유전자의 프로모터를 획득하였다. 이를 도 3에 나타내고 서열번호 3으로 표시하였다.

<59> [실시예 3] 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 세포 내 위치 확인

<60> 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질이 세포막으로 이동하는지 확인하기 위하여, CaPIMP1 유전자의 코딩 영역의 말단에 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)을 코딩하는 유전자를 융합시켜 벡터(vector)를 제조하였다. 그리고 이 구성물(construct)을 이용하여 양파의 표피 세포에 입자총법(particle bombardment)을 이용하여 일시적인 유전자 발현을 유도하여 이를 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<61> 시험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, GFP만을 양파 세포에 발현시키면 세포질을 비롯한 모든 세포에 녹색 형광 단백질이 관찰되었으나(도 4의 a 및 b), CaPIMP1-GFP 융합 단백질은 세포막에서만 관찰되었다(도 4의 c 및 d).

<62> [실시예 4] CaPIMP1 유전자의 유도 발현 탐색 방법

<63> 상기 실시예 1에서 수득한 CaPIMP1 유전자를 이용하여 식물체의 저항성을 탐색하기 위하여 하기와 같이 시험하였다.

<64> 먼저, 상기 실시예 1에서 수득된 CaPIMP1 유전자를 이용한 구체적인 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하기 위하여, 하기와 같이 고추세균성점무늬병균 및 화학 물질 처리에 대한 노던블러팅(Northern Blotting) 시험을 수행하였다.

<65> 각 노던블러팅 수행시 25S 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

<66> [실험예 1] 병원균에 의한 CaPIMP1 유전자의 유도 발현

<67> 고추세균성점무늬병균 중 식물체와 친화적 반응을 나타내는 병원성 균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/㎖의 농도로 1분지기 고추식물체 잎의 뒷면에 배큠-인필트레이션(vacuum-infiltration) 방법으로 접종하고, 28℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리하였다.

<68> 접종 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 각각 잎을 채취하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나일론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

<69> 다음에, 실시예 1에서 수득된 CaPIMP1 유전자를 ^{32}P로 표지한 후, 이를 반응액[0.25M 인산완충액, 7% SDS, 1mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염 (Dextran Sulfate)]에 첨가하고 65℃에서 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다.

<70> 이렇게 ^{32}P로 표지된 상기 DNA 프로브는 나일론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나일론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 상기 CaPIMP1 유전자의 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

<71> 이와 같이 고추세균성점무늬병균의 병원성 균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성 균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 CaPIMP1 유전자의 발현 양상을 도 5에 나타내었다. 도 5에서 숫자는 접종한 후 고추잎 채취시까지의 경과시간을 나타낸다.

<72> 시험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, CaPIMP1 유전자가 세균성점무늬병 감염에 의해 빠르고 강하게 발현되었다. CaPIMP1 유전자 또한 지금까지 알려진 고추 병방어 관련 유전자들의 발현에서처럼 친화적 반응에서 보다 불친화적 반응에서 빠르고 강하게 발현되었다. 그러나 버퍼로 10 mM $MgCl_2$만을 고추 잎에 인필트레이션한 경우는 발현이 유도되지 않았다.

<73> 친화적 반응에서 접종 후 2 시간에 발현되고 18 시간까지 그 발현 양이 유지되다가 24 시간이 되면 그 발현양이 약간 감소하였다. 불친화적 반응에서 CaPIMP1 유전자의 mRNA는 접종 후 1 시간에 처음으로 관찰되고, 2-6 시간

에 발현이 증가하였으며, 12-18 시간에 이르러 최대로 강한 발현을 나타내었다. 불친화적인 균주 접종 24 시간 후에는 18 시간보다 그 발현양이 약간 감소되었으나, 친화적 반응에서의 발현보다는 강하게 나타났다.

<74> 이상과 같은 결과로 볼 때, 식물-병원균 상호 작용에서 나타나는 병방어 관련 유전자의 전형적인 발현 양상과 마찬가지로, CaPIMP1 유전자는 친화적 반응에서보다 불친화적 반응에서 더욱 빠르고 강하게 발현됨을 알 수 있었다.

<75> [실험예 2] 화학적 유도체에 의한 CaPIMP1 유전자의 유도 발현

<76> 본 발명의 CaPIMP1 유전자가 통상 식물병 병 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여, 에틸렌(ethylene), 메틸자스모네이트(methyl jasmonate), 엡시식산(abscisic acid) 및 베타-아미노부티르산(β-aminobutyric acid)에 대하여 저항성 유도 시험을 수행하였다.

<77> 각각의 저항성 유도 시험은 4 엽기의 고추식물을 이용하여 수행되었으며, 각 노던블러팅 수행시 25S 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

<78> 에틸렌 처리를 위해서는, 고추 식물을 500 mL의 유리병에 옮기고 뚜껑을 막은 후, 뚜껑에 있는 실리콘에 5 μl/l의 에틸렌을 주입하였다.

<79> 메틸자스모네이트 처리를 위해서는, 25 μM 농도의 메틸자스모네이트를 고추식물의 잎과 줄기에 골고루 엽면 살포한 후 비닐로 싸 주었다.

<80> 엡시식산은 100 μM의 농도로 준비하고 폿트에 있는 고추식물을 뽑아 그 뿌리를 용액에 담갔다.

<81> 베타-아미노부티르산 처리를 위해서는, 1000 μg/ml 농도의 베타-아미노부티르산을 식물의 잎과 줄기에 골고루 엽면 살포하였다.

<82> 각각의 화학물질을 처리하고 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 각각 고추식물의 잎을 채취하여 이로부터 RNA를 분리한 다음, 상기 실시예 4, 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써 CaPIMP1 유전자의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 6a 내지 도 6d에 나타내었다.

<83> 시험 결과, 도 6a 내지 도 6d에 나타난 바와 같이, 식물병 방어반응에 관련되어 있는 식물체내의 식물 호르몬이자 신호 전달 물질(signal molecules)의 일종인 에틸렌(ethylene), 메틸자스모네이트(methyl jasmonate), 엡시식산(abscisic acid), 베타-아미노부티르산의 외부적인 처리에 의하여 CaPIMP1 유전자의 발현이 유도됨이 관찰되었다.

<84> 에틸렌의 처리에 반응하여 2 시간에 약하게 발현, 6시간에 발현이 증가하다가 그 이후에는 감소경향을 보였다. 메틸자스모네이트와 엽산에 의해서도 6 시간을 전후하여 약하게 발현되었다. 베타-아미노부티르산의 처리로 처리 1 시간에 발현이 관찰되었으며, 2-6 시간에 걸쳐 그 발현이 증가되다 12 시간 이후로 발현이 줄어들어 18 시간 이후는 발현이 관찰되지 않았다.

<85> [실험예 3] 상처 및 저온 스트레스에 의한 CaPIMP1 유전자의 유도 발현

<86> 본 발명의 CaPIMP1 유전자가 상처 및 저온 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<87> 4 엽기 고추 식물의 잎을 바늘로 찔러 준 후, 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간이 지난 후 고추 식물의 잎 조직에서 샘플을 채취하였다.

<88> 4 엽기 고추 식물을 4℃로 유지되는 항온실에 넣고 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간이 지난 후 고추 식물의 잎 조직에서 샘플을 채취하였다.

<89> 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 4의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 상처 및 저온 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 CaPIMP1의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 7a 및 도 7b에 나타내었다.

<90> 시험 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 상처와 저온 스트레스에 의해 CaPIMP1 유전자의 발현이 유도됨이 관찰되었다. 고추 잎에 바늘로 상처를 준 후 30 분 안에 유전자의 발현이 나타났고 1시간 후 그 발현이 약간 줄어든 후 24 시간까지 약한 수준의 mRNA 축적을 나타내었다. 한편 4 ℃의 저온 처리에 의해서는 CaPIMP1의

발현이 상처에 의한 유전자 발현보다 매우 늦게 나타나 24 시간 후에 관찰되었다.

<91> [실시예 5] CaPIMP1 유전자의 프로모터 활성화 탐색 방법

<92> 상기 실시예 2에서 수득한 CaPIMP1 유전자의 프로모터를 이용한 식물체의 저항성 탐색방법을 하기와 같이 시험하였다.

<93> 고추 게놈유전자(genomic DNA)로부터 CaPIMP1 유전자의 시작 코돈 ATG로부터 업스트림(upstream) 부위로 1193 염기를 증폭하여 획득하였다. PLACE 웹사이트(website)를 통하여 이 부위에 스트레스 반응, 호르몬 반응 및 일반적인 대사(metabolism)에 관여한다고 알려진 수많은 시스-작용요소(*cis*-acting elements)가 존재하고 있음을 확인하였다. CaPIMP1 프로모터 부위의 5' 부분을 차례로 결손(deletion)하여 이 DNA 조각들을 pCAMBIA 1381 벡터(vector)에 삽입하여 GUS 리포터 유전자의 앞쪽에 위치하도록 하였다.

<94> 이렇게 제작한 (-1193), (-1017), (-793), (-593), (-417)의 5 개의 프로모터 구성물들(constructs)을 가지고 담배 잎에서의 프로모터 활성을 측정하였다. 그러기 위해 먼저 상기에서 제작한 CaPIMP1과 GUS 리포터 유전자의 융합 벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 균주에 도입하였다.

<95> 이 아그로박테리움을 배양하여 유전자 유도 배지 (0.1xMS, 0.1xB5, 20mM MOPS, pH5.4, 1% glucoase, 2% sucrose, 200 μM acetosyringone)에 현탁하여 담배 잎에 인필트레이션하고 24 시간 동안 습실에서 처리하였다. 습실에서 담배 식물을 꺼낸 후, 이틀 동안 식물 생육 상에서 생육하였다. 이 담배에 담배들불병균인 슈도모나스 시린게 패소바 타바시를 접종하거나, 화학물질들을 처리하여 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성을 GUS 활성으로 표현하였다.

<96> [실험예 1] 담배들불병균 감염에 의한 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성화

<97> 담배들불병균 감염에 의해 나타나는 반응에서 CaPIMP1 유전자의 프로모터의 활성화 양상을 도 8에 나타내었다.

<98> 시험 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, CaPMIP1 프로모터는 담배들불병균인 슈도모나스 시린게 패소바 타바시의 접종에 의해 활성화되었다. (-1193)프로모터는 약 3.14 배의 활성이 증가하였으며, 더 절단한 프로모터 조각인 (-1017)에서 (-417) 프로모터의 경우는 담배들불병균 접종에 대해 활성화되지 않았다. 따라서(-1193)과 (-1017)부위에 담배들불병균에 반응하는 최소한의 활성화 영역이 존재한다할 것이다.

<99> [실험예 2] 화학물질 처리에 의한 CaPIMP1 유전자 프로모터의 활성화

<100> 화학물질 처리에 의해 나타나는 반응에서 CaPIMP1 유전자의 프로모터의 활성화 양상을 도 9에 나타내었다.

<101> 엡시식산은 100 μM의 농도로 담배 식물의 잎에 골고루 엽면 살포하였다.

<102> 소디움나이트로푸르사이트 처리를 위해서는, 100 μg/ml 농도의 소디움나이트로푸르사이트를 담배 식물의 잎에 골고루 엽면 살포하였다.

<103> 에틸렌 처리를 위해서는, 담배 식물을 500 mL의 유리병에 옮기고 뚜껑을 막은 후, 뚜껑에 있는 실리콘에 10 μl/l의 에틸렌을 주입하였다.

<104> 메틸자스모네이트 처리를 위해서는, 50 μM 농도의 메틸자스모네이트를 담배식물의 잎에 골고루 엽면 살포한 후 비닐로 싸 주었다.

<105> 시험 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, CaPIMP1 프로모터는 병원균의 감염뿐 만 아니라 엽산, 소디움나이트로프로사이트, 에틸렌, 메틸자스모네이트 등의 식물방어신호물질의 외부적인 처리에 의해서도 반응하여 활성화되었다.

<106> [실시예 6] CaPIMP1 유전자를 이용한 병저항성 형질전환 애기장대의 제조

<107> 상기 실시예 1에서 수득한 CaPIMP1 유전자 이용한 형질전환식물체 제조를 하기와 같이 시험하였다.

<108> CaPIMP1 유전자를 pBIN35S 바이너리(binary) 벡터에 도입하기 위해 pBluescript SK(-) 벡터에 삽입되어 있는 이 유전자를 제한효소 BamHI과 SacI의 제한 효소를 달아 증폭해 내고, pBIN35S 벡터에 리게이션(ligation) 하였다.

<109> 이 벡터 구성물(construct)을 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 균주에 도입한 후 리팜피신과 카나마이신이 포함된 YEB 배지에서 형질전환된 EHA105 균주를 선발하였다. 이 아그로박테리움을 배양한 후 꽃침지(Floral dipping) 방법을 통하여 애기장대를 형질전환하였다. T_1 종자를 수확하여 카나마이신이 포함된 MS 배지에 파종

하여 형질전환 식물체를 선발하여 각 형질전환 식물체 라인에서 CaPIMP1 유전자가 정상적으로 발현됨을 관찰하였다. 대부분의 실험은 T_2 또는 T_3 종자를 가지고 수행되었다.

<110> [실험예 1] 병원성 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주에 대한 병 저항성

<111> 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주를 King's B 배지에서 배양한 후 수거하여 10^5 cfu/ml로 세균 현탁액을 준비하였다. 바늘이 없는 1 ml 짜리 주사기를 이용하여 야생형과 형질전환 애기장대 식물체의 잎의 뒷면에 세균 현탁액을 인필트레이션 하였고, 식물을 습실 상에서 생육하여 병 진전을 관찰하였다. 접종한 잎을 취하여 10 mM $MgCl_2$로 간 후 시리얼 희석한 용액을 King's B 배지에 도말하여 식물 잎 조직 내에서의 세균의 생장을 모니터링 하였다.

<112> 시험 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 야생형 식물에 비해 형질전환체 식물들은 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주의 감염에 대해 더욱 저항성이 증가되었다.

발명의 효과

<113> 상술한 바와 같이, 본 발명은 고추세균성점무늬병에 대해 저항성을 보이는 고추 한별 품종으로부터 식물병 방어반응에 관련된 신규한 세포막 단백질 유전자를 분리하여 그 염기서열을 결정하고 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열 및 그 프로모터 서열을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 식물병 방어 세포막 단백질 유전자를 이용한 형질전환 벡터 및 형질전환 식물체를 제공한다. 따라서 본 발명은 식물체 병원균에 대한 방어반응의 표지 및 식물병 저항성 작물의 분자육종을 위한 유전재료로 이용될 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

<114> 나아가, 본 발명은 상기 식물병 방어 세포막 단백질 유전자의 차별적 발현을 확인하는 것으로 구성되는 식물병원균, 화학물질 및 환경스트레스에 의한 식물체의 방어반응 여부 판별방법을 제공함으로써 저항성 품종 개발을 촉진시킬 수 있는 효과가 있으므로 식물육종산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자의 염기서열(서열번호 1)을 나타낸 도면이고,

<2> 도 2는 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열(서열번호 2)과, 이 단백질과 유사한 애기장대 식물의 단백질의 아미노산 서열을 비교한 도면이고,

<3> 도 3은 본 발명에 의한 CaPIMP1 유전자의 프로모터 염기서열(서열번호 3)을 나타낸 도면이고,

<4> 도 4는 본 발명에 의한 CaPIMP1 단백질의 세포내 위치를 보여주는 사진이고,

<5> 도 5는 고추 한별 품종에 고추세균성점무늬병을 일으키는 병원성 또는 비병원성 균주를 접종한 후 시간 경과에 따라 나타나는 친화적, 불친화적 상호 작용에서 본 발명에 의한 세포막 단백질 유전자 CaPIMP1의 발현 양상을 나타낸 도면이고,

<6> 도 6a ~ 도 6d는 에틸렌, 메틸자스모네이트, 엡시식산, 베타-아미노부티르산에 의한 본 발명의 세포막 단백질 유전자 CaPIMP1의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

<7> 도 7a 및 도 7b는 상처, 저온에 의한 본 발명의 세포막 단백질 유전자 CaPIMP1의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

<8> 도 8은 담배들불병균 감염에 의한 본 발명의 CaPIMP1 유전자의 프로모터 활성을 나타낸 그래프이고,

<9> 도 9는 엡시식산, 소디움나이트로프루사이트, 에틸렌, 메틸자스모네이트에 의한 CaPIMP1 유전자의 프로모터 활성을 나타낸 그래프이고,

<10> 도 10a 및 도 10b는 병원성 슈도모나스 시린게 패소바 토마토 DC3000 균주 감염에 대한 본 발명의 CaPIMP1 유전자 도입 형질전환 애기장대의 병 저항성을 나타내는 도면이다.

도면

도면1

```
   1 CGCACACAAAAAAAAAAAAAAAACCTAGTTTAAATTCAATAAAATTTATTTTATTTTGCTT
  61 CTATTTTAGTTGAATAGACAAAGTGAAATGACACCGCCACCAACTACCACTGTTCCTCCT
 121 TACGTTAGCCTCATCGTGAGGATCCTTACGTTGATTTGCTTGTTGATTTCATTCATCGTG
 181 ATTGCCACCAACAATCAGACGGTTAGTACCGTTGCTGGTGATGTCAAAATCAAGTTTAAG
 241 GACTTTTATGCTTACAGATATTTAATTGCTACTGTGATTATTGGAATGGCATATACTCTT
 301 CTTCAAATTGCCTTTTCAATTTCCCTTTTGACTACTGGAAATCGCATTGGTGGTGAAGGG
 361 TTTCTTCTTTTTGACTTCTACGGTGACAAGTTTATTTCCTACTTCCTAGTTACCGGAGCA
 421 GCAGCAAGTTTTGGTATGACACAAGATTTAAAGCAACTTGAAGGAAGTGATAACTATAGT
 481 AAATTTCTCAACACTTCAAATGCTGCAGCAAGTCTTTGTCTAATTGGATTCTTTTTTGCT
 541 GTTGCTTCATCAATTTTCTCATCTTATAATCTTCCAAAGAGAATTTGATTTTTTTTTTGA
 601 AAAAGTAATAGTTTGATTCAGTGTTTCGAGAAATTATGTTTTATAGGATTTTCGAAGATG
 661 ATCTAGATATTGGGTCAAATTACGTTTATTATAAGTCCCAACAATAGAGTGGTTCTCCCG
 721 GCAAGGAGTCGTAACATTTGTTGGTGTACCTCATAGTTTGGGCTGTAGCTTCTTCTTCTT
 781 TTGCCACATTTGGATAGTTTTTTATGAAGTGTTGAGATGTAATATTTGTATTTTATTTGA
 841 AATTGTATGTAATTGTTTAAGTTGGTGAAGTTGTGTGAATTTCAAGTTGGATTTTGTGTT
 901 ATTTATGTAATTCTTTGTTTTGAGAATAGTCTTCAATTTGGGTATTTTCTTGTGTATTCT
 961 TTAGAAATTGTATTTTTCAAAGTCGATACAAATATAAGCCAGCTAAAAAGCAAACATTTA
1021 ATATATGAAATTCGTCTTTAGCACATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

도면2

```
Pepper CaPIMP1          MTPPPTTTVPPAVSLIVRIIDLIGLLISGIVIATNNQTVS   40
Arabidopsis (BAD93967)  MAPPPPS--PPAVSLKVLILDLRVLTGVGLVIALIILSTN   38
Arabidopsis (NP_181485) MAPPPPA--PPSVILRTVLLDLRVLTAPGLLITVVLISTN   38
Arabidopsis (T00563)    MAPPPPA--PPSVILRTVLLDLRVLTAPGLLITVVLISTN   38

Pepper CaPIMP1          TVAGD-----VKIKGKDGYAYRYLIATVIIGMPYTLLQIA   75
Arabidopsis (BAD93967)  SVTIVSQGSALKFHGKDVYAYRYMLSAAVIGLVYAVIQLF   78
Arabidopsis (NP_181485) TVTLEISSTSIKLPGNDVYAYRYMLSAAVIGLVYAVVQLF   78
Arabidopsis (T00563)    TVTLEISSTSIKLPGNDVYAYRYMLSAAVIGLVYAVVQLF   78

Pepper CaPIMP1          FSISLLTTGNRIGGEGFLLFDFYGDK-PISYPLVTGAAAS  114
Arabidopsis (BAD93967)  FTISEFATGVKNPFNYQL--DFYGDKL-ISYLVATGSAAG  115
Arabidopsis (NP_181485) LTISQFATGKTHPLTYQ--PDFYGDKV-ISYLLATGSAAG  115
Arabidopsis (T00563)    LTISQFATGKTHPLTYQ--PDFYGDKVPISY-PLRKYYL--  113

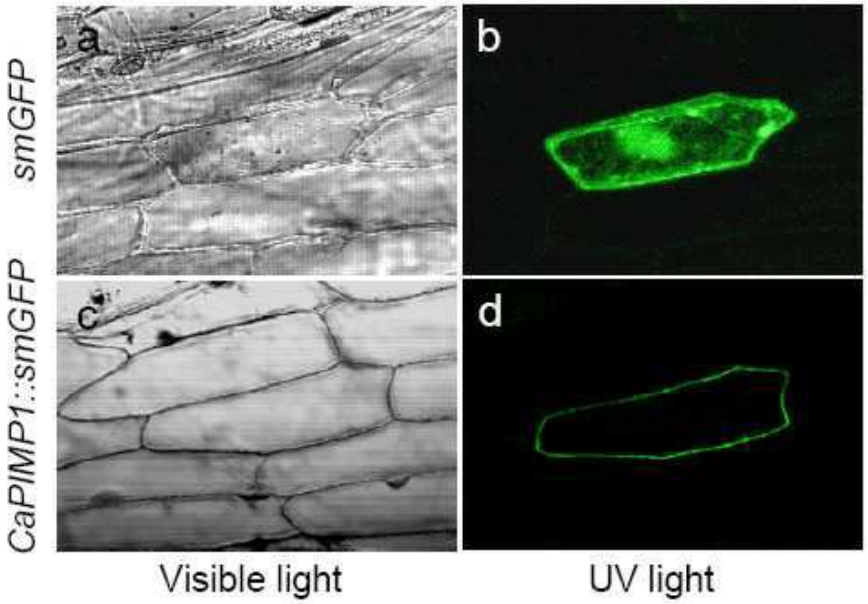
Pepper CaPIMP1          FGMTQDLKQLEGSDNY--S-----KFLNTSNAAASLCLIG  147
Arabidopsis (BAD93967)  FGVTKDLKDTFLALVALDSTDPVDKFFSKGYASASLLLFA  155
Arabidopsis (NP_181485) FGVSKDLKDTYIALIEFDSTDPVDKFFSKGYASASLLLFA  155
Arabidopsis (T00563)    ----------------------------------------  113

Pepper CaPIMP1          FFF-AVASSIFSSYNLPKRI----      166
Arabidopsis (BAD93967)  FICLAVL-SVFSSFAMAKRN----     174  (38.04%)
Arabidopsis (NP_181485) FVSLAVL-SVFSSLALSKRPVPVS     178  (36.96%)
Arabidopsis (T00563)    -------------------------     113  (22.83%)
```

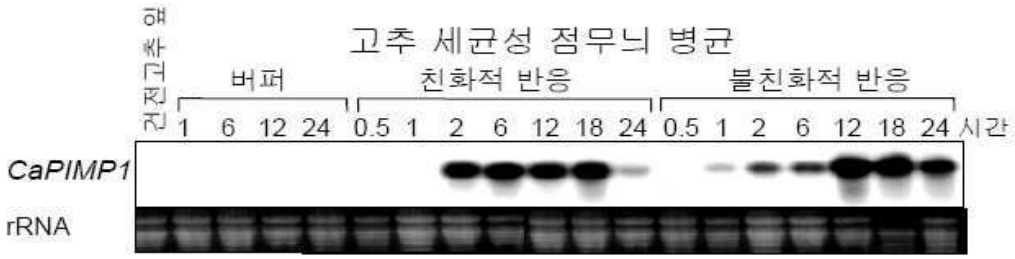
도면3

```
   1 ACTTGTGAGAAATAGTTTGAGTTTTATCAATAAATTTTAAAAAACACTTTTGCATAGCAA
  61 TTAATGTGAAGTGTAATTTTCTTAACAGCGTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGGTTT
 121 TGAAATAAGTTGTTTATTTAGCTTATGAAAAGTTATTTTTTTATTCTCCAAAAATACTTA
 181 TTTCTTTCAAAAGCTTAACCGCAATCCTCAATTATTTATTCAACGTATATCAGAGAAAAT
 241 GACACAAATAAAGTATCAAGTGCATTTACTAGGAAATTTCTCATTAAATAAATGCTCCAT
 301 TTACTTAAAAATCCTGTTAAATGGGAAGGAATTTGTTCAGTAATTACATATAAATTTCTA
 361 ATTAATGGGTGATTTTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTTAAATATATTCGATCAATATTCAA
 421 GAATTGATAATTGAAAGTATTTCATTTATAGTCCAGTCATTCATCTTTATGCTAATCACG
 481 TTTTGTTTAGGAGGAGTGATTTGATTAATCTTCGGCATAAATTATAAGTTAGATTAGTTC
 541 AATATTTGAAATTTAACAAAACCCATATGGAAAACACAAATAAGTATGATTTTTCTCATA
 601 TTAATAGGATGAAAATACATATTAAAATATCGATCAAAGTTCATATAGTTTGACTCTCAA
 661 TAAACGAAATGTGATAAGTAAAAATAACAAAGAAAGTAATGAATCGATTAACGAACTGTA
 721 TGAAAGTTGAATCCCACCCCCACGCCAACCCACCCCTCCCACTTTTTTTTAAAATAATTA
 781 TGTTGTTTGAAACAACGTGTATCTTAATAATTTTATGAATTATCTAAACAACGTTACCCG
 841 TTATTTCCCATCAACGTCGATATTTTTAAACTTACGCGTCATTTAGAACAAATTTAAAGC
 901 AAACAAAAGGAATAAACGACCCAAAAAAAAAATTCAAAGTAAACTCTCTATGTGTGGAAAC
 961 AAATTAAATAACGATTTAAATTAAATTGTACATTGACTTCTGACTTAAACAAAGTCAACA
1021 TTTCTATGCCTTCTCCTTTTTTTTTTCTATATAAGCAAAACACATCTCATAGTATATTCA
1081 CTACAAGAAGAAGAAAAAAAAAGCTTTGCGCACACACAAAAAAAAAAAACCTAGTTTAAAT
1141 TCAATAAAATTTATTTTATTTTGCTTCTATTTTAGTTGAATAGACAAAGTGAA
```

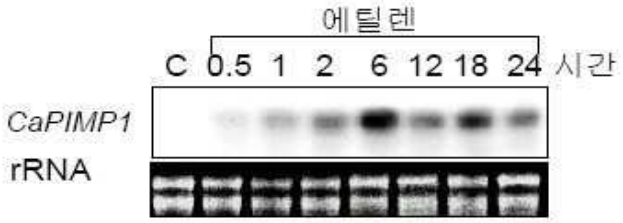
도면4



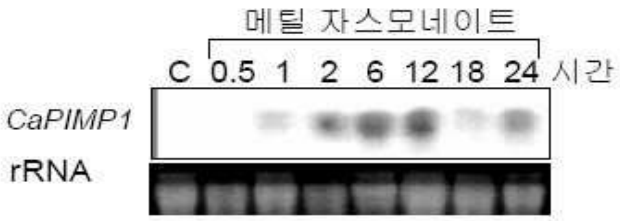
도면5



도면6a



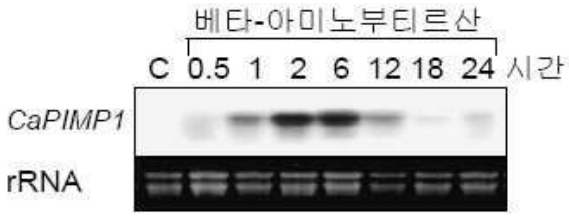
도면6b



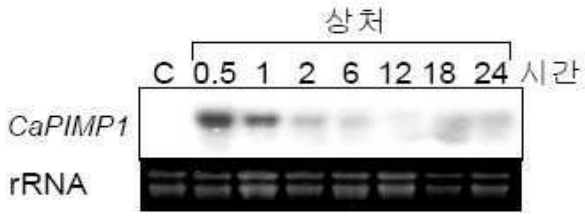
도면6c



도면6d



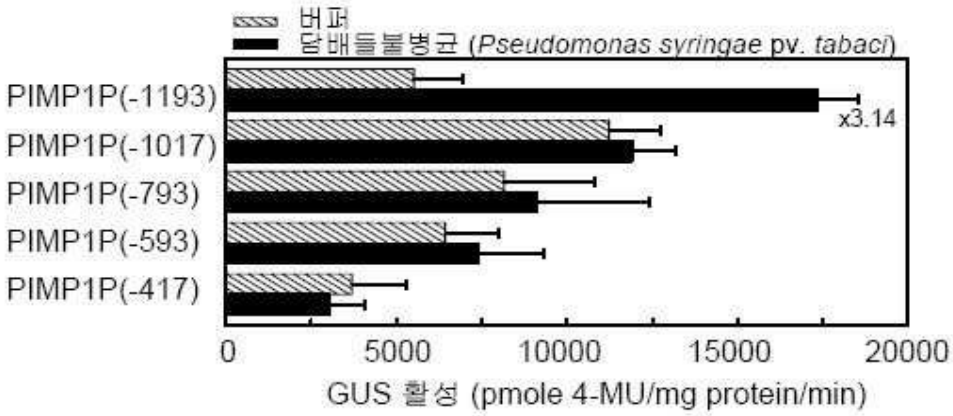
도면7a



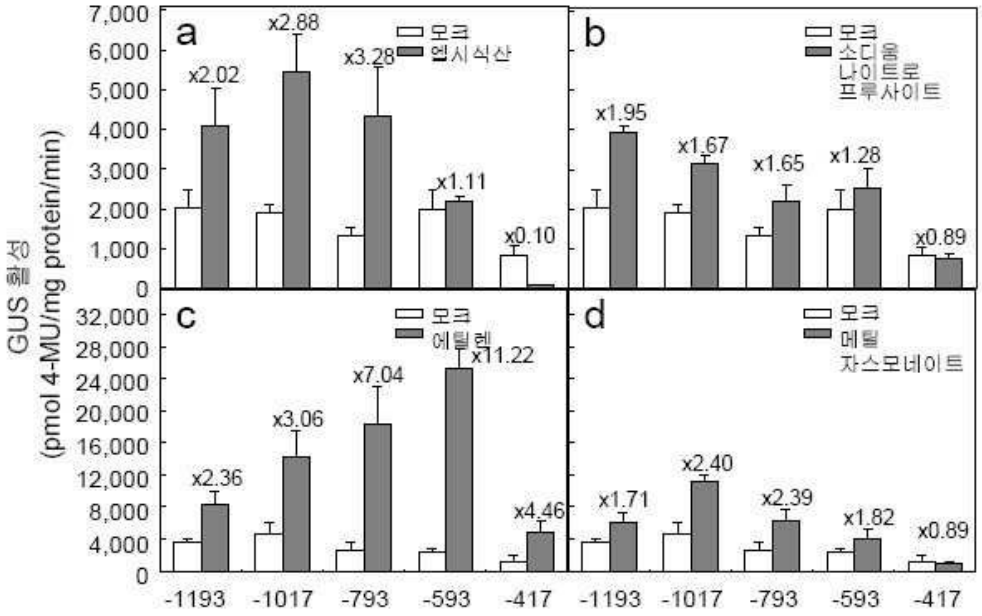
도면7b



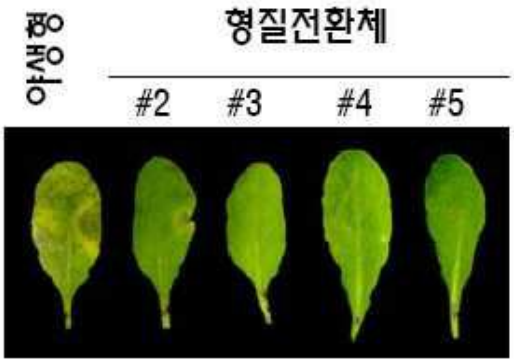
도면8



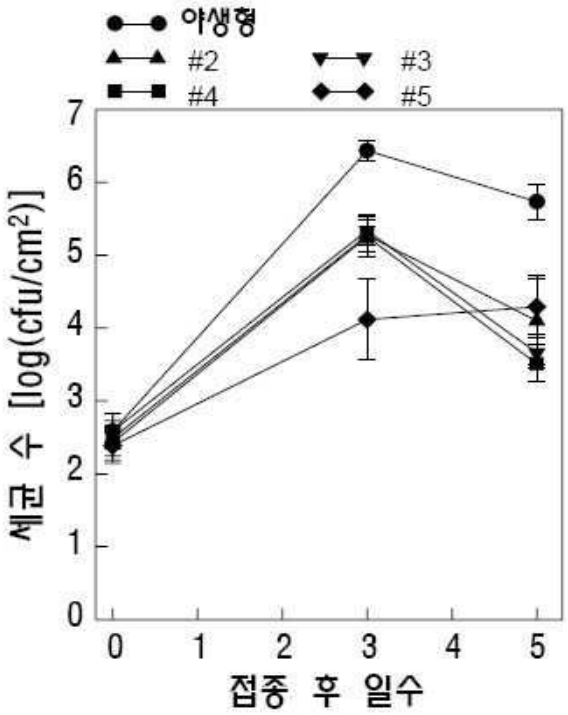
도면9


GUS 활성
(pmol 4-MU/mg protein/min)
a
모크
엽시식산
x2.02
x2.88
x3.28
x1.11
x0.10
b
모크
소디움
나이트로
프루사이트
x1.95
x1.67
x1.65
x1.28
x0.89
c
모크
에틸렌
x2.36
x3.06
x7.04
x11.22
x4.46
d
모크
메틸
자스모네이트
x1.71
x2.40
x2.39
x1.82
x0.89
-1193
-1017
-793
-593
-417

도면10a


형질전환체
#2
#3
#4
#5
병원성 수도모나스 시린게
패소바 토마토 DC3000 균주

도면10b



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Plant membrane protein gene CaPIMP1 and its promoter, and disease-resistant transgenic plants using the sam

<130> P11-051229-01

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1069

<212> DNA

<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 1

cgcacacaaa aaaaaaaaaa aacctagttt aaattcaata aaatttattt tattttgctt 60

ctattttagt tgaatagaca aagtgaaatg acaccgccac caactaccac tgttcctcct 120

tacgttagcc tcatcgtgag gatccttacg ttgatttgct tgttgatttc attcatcgtg 180

attgccacca acaatcagac ggttagtacc gttgctggtg atgtcaaaat caagtttaag 240

gacttttatg cttacagata tttaattgct actgtgatta ttggaatggc atatactctt 300

cttcaaattg ccttttcaat ttccctttg actactggaa atcgcattgg tggtgaaggg 360

tttcttcttt ttgacttcta cggtgacaag tttatttcct acttcctagt taccggagca 420

gcagcaagtt ttggtatgac acaagattta aagcaacttg aaggaagtga taactatagt 480

aaatttctca acacttcaaa tgctgcagca agtctttgtc taattggatt ctttttgct 540

gttgcttcat caattttctc atcttataat cttccaaaga gaatttgatt tttttttga 600

aaaagtaata gtttgattca gtgtttcgag aaattatgtt ttataggatt ttcgaagatg 660

atctagatat tgggtcaaat tacgtttatt ataagtccca acaatagagt ggttctcccg 720

gcaaggagtc gtaacatttg ttggtgtacc tcatagtttg ggctgtagct tcttcttctt 780

ttgccacatt tggatagttt tttatgaagt gttgagatgt aatatttgta ttttatttga 840

aattgtatgt aattgtttaa gttggtgaag ttgtgtgaat ttcaagttgg attttgtgtt 900

atttatgtaa ttctttgttt tgagaatagt cttcaatttg ggtattttct tgtgtattct 960

ttagaaattg tatttttcaa agtcgataca aatataagcc agctaaaaag caaacattta 1020

atatatgaaa ttcgtcttta gcacatttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1069

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 2

Met Thr Pro Pro Pro Thr Thr Thr Val Pro Pro Tyr Val Ser Leu Ile
1 5 10 15

Val Arg Ile Leu Thr Leu Ile Cys Leu Leu Ile Ser Phe Ile Val Ile
20 25 30

Ala Thr Asn Asn Gln Thr Val Ser Thr Val Ala Gly Asp Val Lys Ile
35 40 45

Lys Phe Lys Asp Phe Tyr Ala Tyr Arg Tyr Leu Ile Ala Thr Val Ile
50 55 60

Ile Gly Met Ala Tyr Thr Leu Leu Gln Ile Ala Phe Ser Ile Ser Leu
65 70 75 80

Leu Thr Thr Gly Asn Arg Ile Gly Gly Glu Gly Phe Leu Leu Phe Asp
85 90 95

Phe Tyr Gly Asp Lys Phe Ile Ser Tyr Phe Leu Val Thr Gly Ala Ala
100 105 110

Ala Ser Phe Gly Met Thr Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu Gly Ser Asp
115 120 125

Asn Tyr Ser Lys Phe Leu Asn Thr Ser Asn Ala Ala Ala Ser Leu Cys
130 135 140

Leu Ile Gly Phe Phe Phe Ala Val Ala Ser Ser Ile Phe Ser Ser Tyr
145 150 155 160

Asn Leu Pro Lys Arg Ile
165

<210> 3

<211> 1193

<212> DNA

<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 3

acttgtgaga aatagtttga gttttatcaa taaattttaa aaaacacttt tgcatagcaa 60

ttaatgtgaa gtgtaatttt cttaacagcg ttttttcaaaa aaaaaaaaaa aaaggggttt 120

tgaaataagt tgtttattta gcttatgaaa agttatttttt ttattctcca aaaatactta 180

tttctttcaa aagcttaacc gcaatcctca attatttatt caacgtatat cagagaaaat 240

gacacaaata aagtatcaag tgcatttact aggaaatttc tcattaaata aatgctccat 300

ttacttaaaa atcctgttaa atgggaagga atttgttcag taattacata taaatttcta 360

attaatgggt gattttgtgt gtgtgtgttt ttttttttaaa tatattcgat caatattcaa 420

gaattgataa ttgaaagtat ttcatttata gtccagtcat tcatctttat gctaatcacg 480

ttttgtttag gaggagtgat ttgattaatc ttcggcataa attataagtt agattagttc 540

aatatttgaa atttaacaaa acccatatgg aaaacacaaa taagtatgat ttttctcata 600

ttaataggat gaaaatacat attaaaatat cgatcaaagt tcatatagtt tgactctcaa 660

taaacgaaat gtgataagta aaaataacaa agaaagtaat gaatcgatta acgaactgta 720

tgaaagttga atcccacccc cacgccaacc caccctccc actttttttt aaaataatta 780

tgttgtttga aacaacgtgt atcttaataa ttttatgaat tatctaaaca acgttacccg 840

ttatttccca tcaacgtcga tatttttaaa cttacgcgtc atttagaaca aatttaaagc 900

aaacaaaagg aataaacgac ccaaaaaaaa attcaaagta aactctctat gtgtggaaac 960

aaattaaata acgatttaaa ttaaattgta cattgacttc tgacttaaac aaagtcaaca 1020

tttctatgcc ttctccttttt ttttttctat ataagcaaaa cacatctcat agtatattca 1080

ctacaagaag aagaaaaaaa agctttgcgc acacacaaaa aaaaaaaacc tagtttaaat 1140

tcaataaaat ttattttatt ttgcttctat tttagttgaa tagacaaagt gaa 1193

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 4
aaatgtttct gacaaaattt catagttt 28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 5
agcataaaag tccttaaact tgattttga 29